



ANABELA MARQUES DESEMPENHO DE DOIS MÉTODOS DE DETECÇÃO
CARVALHO SIMÕES DO ANTICOAGULANTE LÚPICO



Universidade de Aveiro Departamento de Biologia
Ano 2010

**ANABELA MARQUES
CARVALHO SIMÕES**

**DESEMPENHO DE DOIS MÉTODOS DE DETECÇÃO
DO ANTICOAGULANTE LÚPICO**

Dissertação apresentada à Universidade de Aveiro para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Biologia Molecular e Celular, realizada sob a orientação científica da Doutora Margarida Lourenço, Médica Especialista do Laboratório de Hematologia do Serviço de Patologia Clínica dos Hospitais da Universidade de Coimbra, EPE, e co-orientação da Doutora Maria de Lourdes Pereira, Professora Associada com Agregação do Departamento de Biologia da Universidade de Aveiro.

Dedico este trabalho à minha filha e aos meus pais pelo incansável apoio.

o júri

presidente

Professora Doutora Adelaide Almeida
Professora Auxiliar do Departamento de Biologia da Universidade de Aveiro

Doutora Margarida Lourenço (orientadora)
Médica Especialista em Patologia Clínica nos Hospitais da Universidade de
Coimbra, EPE

Professora Doutora Maria de Lourdes Pereira (co-orientadora)
Professora Associada com Agregação do Departamento de Biologia da
Universidade de Aveiro

Doutora Lénia Jorge (arguente)
Médica Especialista em Patologia Clínica nos Hospitais da Universidade de
Coimbra, EPE

agradecimentos

Agradeço à Doutora Margarida Lourenço e à Doutora Maria de Lourdes Pereira a orientação científica deste trabalho.

Agradeço à Doutora Graça Ribeiro, Directora do Laboratório de Hematologia do Serviço de Patologia Clínica dos Hospitais da Universidade de Coimbra, EPE, pela oportunidade de realizar este trabalho.

Agradeço, em especial, à Doutora Barbara Ribeiro (*IZASA*) pela amizade, apoio incansável e oferta do *Kit Silica Clotting Time* sem o qual não seria possível realizar este trabalho.

Agradeço ao Doutor Matias Girbau (*IZASA*) pela amizade e colaboração no suporte bibliográfico.

Agradeço a Doutora Margarida Pocinho, pela oportunidade que me deu em adquirir novos conhecimentos, através dos seus ensinamentos que foram fundamentais na análise estatística deste trabalho.

Agradeço a todos os colegas do Laboratório de Hematologia do Serviço de Patologia Clínica dos Hospitais da Universidade de Coimbra, pelo seu extraordinário apoio e amizade.

Finalmente, agradeço, aos meus pais por todo o amor e compreensão que têm tido para comigo ao longo da minha vida, à minha filha pelo carinho e amizade fundamental na realização deste trabalho, ao meu irmão e cunhada por todo o carinho e compreensão que tiveram para comigo.

palavras-chave

anticoagulante lúpico, síndrome anti-fosfolípido, *silica clotting time*, tempo de veneno da víbora de *Russel* diluído.

resumo

O anticoagulante lúpico é um anticorpo adquirido, frequentemente associado a trombozes venosas e/ou arteriais e complicações na gravidez, que interfere com os testes de coagulação dependentes dos fosfolípidos. A sua detecção laboratorial é baseada em critérios definidos pelo Subcomité de Anticoagulante Lúpico/ Anticorpos Anti-Fosfolípidicos do Comité Científico de Normalização da Sociedade Internacional de Trombose e Hemostase (2009). Os mesmos recomendam a utilização de dois testes em simultâneo com distintos princípios analíticos e diferentes concentrações de fosfolípidos. No presente trabalho avaliou-se o comportamento de dois reagentes comerciais (*Lúpus Anticoagulant* da *Siemens* e *Silica Clotting Time* da *Hemosil*) na detecção laboratorial do anticoagulante lúpico. Dado o reduzido número de amostras positivas recomenda-se o prolongamento do estudo. Os reagentes mostraram um grau de concordância excelente, no entanto, numa análise preliminar o reagente *Silica Clotting Time* mostrou uma maior capacidade de detecção. De acordo com esta observação foram propostos critérios de utilização dos dois reagentes na rotina do Laboratório de Hematologia do Serviço de Patologia Clínica dos Hospitais da Universidade de Coimbra, EPE.

keywords

antiphospholipid syndrome, lupus anticoagulant, silica clotting time, viper venom time dilute Russell.

abstract

Lupus anticoagulants are acquired circulating anticoagulants that interfere with phospholipid -dependent coagulation tests and are frequently associated with thromboembolic disorders and obstetric complications. Lupus anticoagulants are diagnosed according to the criteria proposed by the Scientific and Standardization Committee on Lupus Anticoagulant/Antiphospholipid Antibodies of the International Society of Thrombosis and Hemostasis (2009). They recommend using two tests simultaneously with different analytical principles and different concentrations of phospholipids. In this study were evaluated the performance of two commercial reagents (Lupus Anticoagulant of Siemens and Silica Clotting Time of Hemosil) in laboratory detection of LA. Given the low number of positive samples is recommended to extend the study. Reagents showed an excellent level of agreement, however, a preliminary analysis reagent Silica Clotting Time suggests have a greater capacity to detect. According to this observation were proposed criteria for use of two reagents in routine Hematology Laboratory of Clinical Pathology Service of the University Hospitals of Coimbra, EPE.

ÍNDICE

1	INTRODUÇÃO.....	1
1.1	Sistema Hemostático.....	1
1.2	Avaliação laboratorial da coagulação.....	5
1.3	Síndrome anti-fosfolípídico.....	6
1.3.1	Anticorpos anti-fosfolípidicos.....	7
1.3.2	Anticoagulante lúpico.....	8
1.3.3	Mecanismos de acção dos anticorpos anti-fosfolípidicos.....	9
1.3.4	Aspectos clínicos do síndrome anti-fosfolípídico.....	9
1.3.4.1	Tromboses venosas e arteriais.....	10
1.3.4.2	Abortos de repetição.....	10
1.3.4.3	Manifestações hematológicas.....	10
1.3.4.4	Manifestações dermatológicas.....	11
1.3.4.5	Manifestações cardíacas.....	11
1.3.4.6	Manifestações neurológicas.....	11
1.3.4.7	Manifestações renais.....	11
1.3.4.8	Síndrome anti-fosfolípídico catastrófico.....	12
1.3.4.9	Lúpus eritematoso sistémico.....	12
1.3.5	Avaliação diagnóstica do síndrome anti-fosfolípídico.....	13
1.3.6	Detecção laboratorial do anticoagulante lúpico.....	14
1.3.6.1	Colheita e preparação da amostra.....	15
1.3.6.2	Seleção dos pacientes.....	15
1.3.6.3	Testes para a detecção do anticoagulante lúpico.....	16
1.3.6.4	Expressão dos resultados.....	18
1.4	Enquadramento do tema.....	18
1.5	Objectivos.....	19
2	MATERIAL E MÉTODOS.....	20
2.1	Caracterização da população em estudo.....	20
2.2	Material biológico.....	21
2.3	Reagentes.....	21
2.4	Preparação das amostras de sangue periférico.....	23

2.5	Determinação dos valores de normalidade <i>SCT Screen</i> e <i>SCT Confirm</i>	23
2.6	Expressão dos resultados e valores de referencia.....	24
2.7	Análise estatística.....	24
3	RESULTADOS	25
4	DISCUSSÃO.....	27
5	CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS FUTURAS.....	30
6	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	31
	ANEXO I.....	36

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 - Adesão e agregação plaquetar.....	2
Figura 2 - Esquema da cascata da coagulação proposto na década de 1960, com a divisão do sistema da coagulação em duas vias...	3
Figura 3 - Visão actualizada da cascata da coagulação	4
Figura 4 - Visão geral do Sistema Hemostático.....	4
Figura 5 - Factores da coagulação avaliados pelo TTPA e TP.....	6
Figura 6 - Mecanismo de acção dos testes TVVRd e SCT na cascata da coagulação.....	17
Figura 7 - Ratios normalizados obtidos nos testes LA e SCT.....	25
Figura 8 - Informação clínica dos doentes com amostras positivas.	26
Figura 9 - Esquema de utilização dos reagentes na detecção laboratorial futura do AL.....	30

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1 -	Informação clínica da população em estudo.....	20
Tabela 2 -	Resultados da análise estatística do teste diagnóstico, tendo como padrão de ouro o teste LA.....	26
Tabela 3 -	Resultados da análise estatística realizada com o teste diagnóstico, tendo como padrão de ouro o teste SCT.....	26

SIGLAS E ABREVIATURAS

AAF.....	Anticorpos anti-fosfolípidicos
Abort. Rep.....	Abortos de repetição
ADP.....	Adenosina difosfato
AL.....	Anticoagulante lúpico
β2GPI.....	β 2 - glicoproteína I
CAPM.....	Cinínogénio de alto peso molecular
DAI.....	Doença auto-imune
ELISA.....	<i>Enzyme linked immuno sorbent assay</i>
EPE.....	Empresa Privada do Estado
GPIIIa.....	Glicoproteína III a
GPIb.....	Glicoproteína I b
GPIIb.....	Glicoproteína II b
HLA.....	<i>Human Leukocyte Antigen</i>
IgG.....	Imunoglobulina tipo G
IgM.....	Imunoglobulina tipo M
LES.....	Lúpus eritematoso sistémico
PK.....	Pré-caliceína
PL.....	Fosfolípidos
SAF.....	Síndrome anti-fosfolípido
SCT.....	<i>Silica clotting time</i>
SCTH.....	<i>Silica clotting time da Hemosil</i>
TP.....	Tempo de protrombina
TTPA.....	Tempo de tromboplastina parcial activado
TVVRd.....	Tempo de veneno da víbora de Russell diluído
UK NEQAS.....	<i>United Kingdom National External Quality Assessment Service</i>
VDRL.....	<i>Veneral disease research laboratory</i>
vWF.....	Factor de von Willebrand

1. INTRODUÇÃO

1.1 Sistema Hemostático

O sistema hemostático protege o sistema vascular e permite que, em caso de lesão, os tecidos sejam reparados e as suas funções restabelecidas. É um processo rápido e eficiente que preserva a integridade da circulação sanguínea, e limita a perda de sangue nos locais de lesão vascular. Estritamente auto regulado pelo organismo, evita o desenvolvimento de coágulos extensos e consegue lisá-los logo após a reparação do dano (1). A sequência de reacções locais que culmina no controlo da hemorragia, a partir de um vaso lesado, define-se como Hemostase. A multiplicidade de elementos envolvidos neste processo permite uma resposta progressiva que pode ser dividida em três fases: resposta vascular, hemostase primária e secundária (2).

Resposta vascular: a constrição imediata dos vasos lesados e a constrição reflexa das artérias e arteríolas adjacentes, permite a redução do fluxo sanguíneo da área afectada e a manutenção das superfícies endoteliais justapostas. Esta resposta é transitória e apenas se mostra eficaz nos pequenos vasos da microcirculação. A diminuição do fluxo sanguíneo permite a activação de contacto das plaquetas e dos factores da coagulação.

Hemostase primária: no seu estado basal, as plaquetas têm um contorno discoidal e não apresentam interacções com o meio envolvente. Contudo, após uma lesão vascular iniciam, de uma maneira rápida, uma série de alterações estruturais e metabólicas. A membrana plaquetar é constituída basicamente por uma dupla camada fosfolípídica com os extremos hidrófobos localizados no centro da mesma (3). Durante a activação plaquetar ocorre um reordenamento molecular com transferência do fosfolípido fosfatidilserina para a superfície da membrana plaquetar, constituindo um suporte de carga negativa, sobre o qual se vai desenrolar o processo de coagulação (hemostase secundária). Alguns destes

fosfolípidos participam também na síntese de mediadores essenciais para a agregação plaquetar como o tromboxano A₂. De uma maneira simplificada a hemostase primária compreende (4) (Figura 1):

- Alteração da morfologia das plaquetas, tornando-se espiculadas, e expressão de fosfolípidos de carga negativa à sua superfície (fosfatidilserina).
- Adesão das plaquetas ao subendotélio através da Glicoproteína I b (GP Ib).
- Liberação do conteúdo de granulações citoplasmáticas das plaquetas (grânulos α e densos), com liberação de Adenosina Difosfato (ADP) que vai amplificar o processo de agregação.
- Expressão de receptores de superfície (glicoproteínas II b/IIIa - GPIIb/GPIIIa) que possibilita a ligação a outras plaquetas por intermédio do fibrinogénio e do factor de *von Willebrand* (vWF). A trombina, tromboxano A₂ e ADP são os principais responsáveis pela amplificação do processo, que resulta na formação do trombo plaquetar cujo efeito hemostático é transitório.

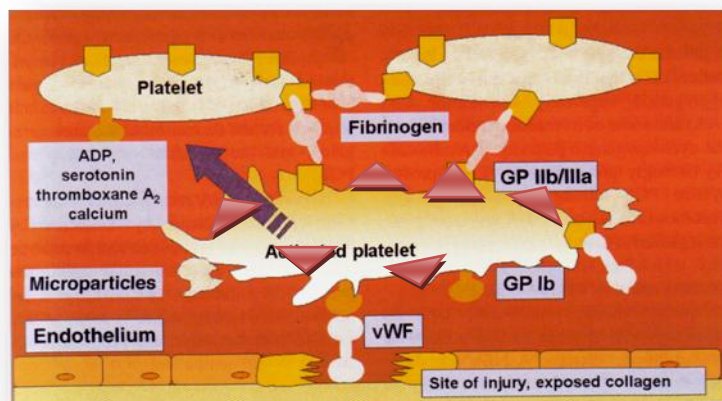


Figura 1 - Adesão e agregação plaquetar (4). (▲ = fosfatidilserina)

Hemostase secundária: A activação dos factores da coagulação ocorre simultaneamente à activação das plaquetas. Em 1964, Macfarlane, e Davie e Ratnoff propuseram o modelo da “cascata” (Figura 2) para explicar a fisiologia da coagulação do sangue (5-6), segundo o qual, a coagulação ocorre por meio de activação proteolítica sequencial de pró-enzimas por proteases do plasma, resultando na formação de trombina que, então, converte a molécula de

fibrinogenio solúvel em fibrina insolúvel (posteriormente degradada em produtos de degradação da fibrina pelo sistema fibrinolítico). De acordo com este modelo, a coagulação era iniciada por componentes presentes no plasma (via intrínseca) ou por reacções dependentes de componentes teciduais (via extrínseca). Estas duas vias convergem numa terceira (via final comum), cujo resultado é a formação de fibrina, a qual, ao formar uma rede com o tampão plaquetar inicial irá torná-lo mais resistente e duradouro, a fim de restaurar o fluxo sanguíneo normal (7).

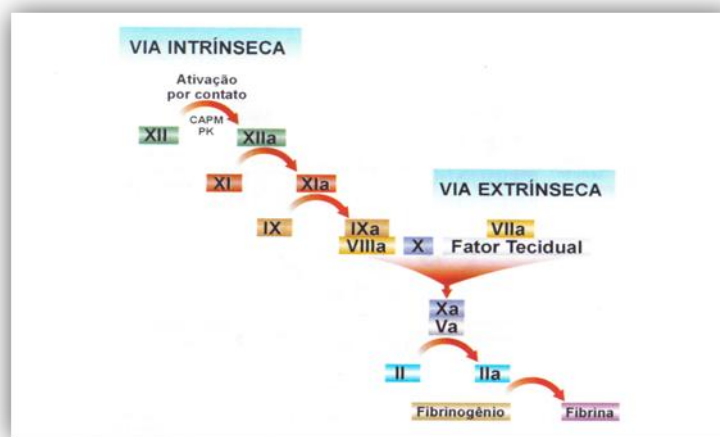


Figura 2 - Esquema da cascata da coagulação proposto na década de 1960, com a divisão do sistema da coagulação em duas vias. CAPM: Cinínógeno de Alto Peso Molecular; PK: Pré-Calicreína (2).

Actualmente, e sob o ponto de vista fisiológico a divisão da cascata em duas vias independentes é inadequada. Com este modelo não se compreendia, por exemplo, como é que um indivíduo portador de deficiência de factor XII não apresentava manifestações hemorrágicas, e estas eram evidentes numa deficiência de factor VIII ou IX. Sabe-se hoje, que, os mecanismos hemostáticos fisiologicamente relevantes estão associados a três complexos enzimáticos pró-coagulantes, que envolvem serino-proteases dependentes da vitamina K (factores II, VII, IX e X) associadas a co-factores (factor V e VIII) (2). A nova hipótese de coagulação *in vivo*, considera apenas uma via em que todos os factores interferem, onde a trombina tem um papel amplificador e central em todo o processo (activação de factores, agregação, fibrinólise) (8) (Figura 3).

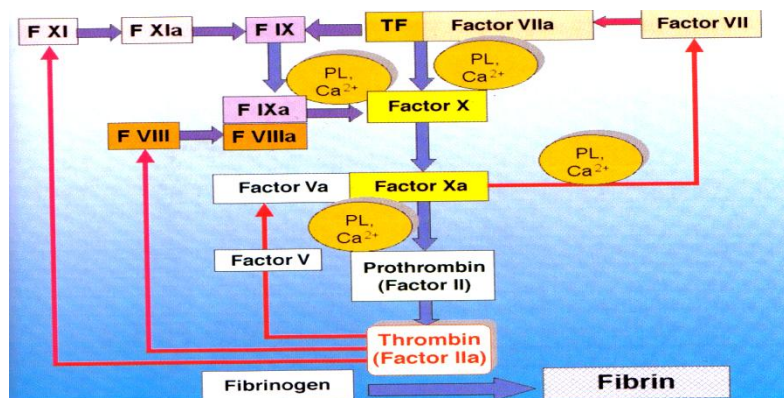


Figura 3 - Visão actualizada da cascata da coagulação (setas a vermelho = feedback positivo; PL: fosfolípidos; Ca^{2+} : cálcio) (4).

As reacções bioquímicas da coagulação requerem o envolvimento dos fosfolípidos das membranas plaquetares e de iões de cálcio, sendo estritamente controladas por proteínas inibitórias, que actuam como anticoagulantes naturais. As mais importantes são a proteína C, a proteína S, a antitrombina III e o factor inibidor da via do factor tecidual. O sistema hemostático é um equilíbrio entre mecanismos coagulantes e anticoagulantes associados a um processo de fibrinólise que actua no controlo da hemorragia (Figura 4) (1).

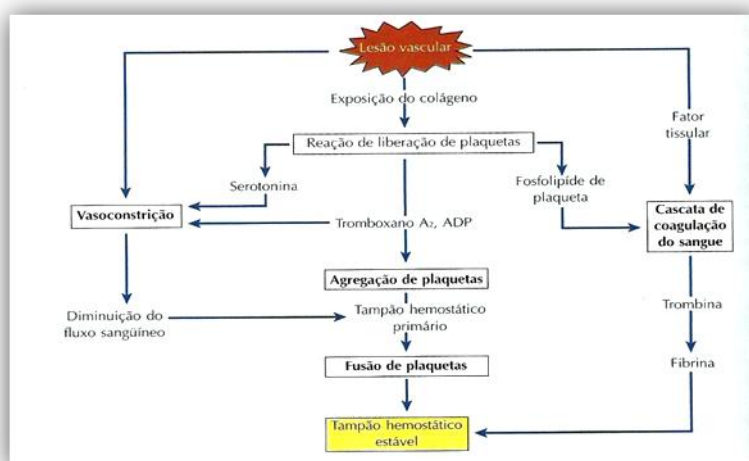


Figura 4 - Visão geral do Sistema Hemostático (1).

No entanto, os testes de avaliação laboratorial da hemostase continuam a basear-se no modelo inicialmente proposto por Macfarlane e Davie e Ratnoff em 1964, pelo que, a divisão da cascata da coagulação continua a ter muita importância sob o ponto de vista clínico.

1.2 Avaliação laboratorial da hemostase

A qualidade da amostra é determinante para uma correcta interpretação dos testes de coagulação. A colheita de sangue deve ser a menos traumática possível, com o mínimo de estase venosa, dado que a punção expõe o factor tecidual, capaz de activar a coagulação. O citrato de sódio é utilizado como anticoagulante na proporção 9:1 (2). O sangue citratado é depois centrifugado durante quinze minutos a 3000rpm, de modo a obter-se plasma pobre em plaquetas, a partir do qual se faz o estudo laboratorial da coagulação.

A evolução tecnológica tem proporcionado ao longo do tempo, o desenvolvimento de novas metodologias em laboratórios de análises clínicas. Estas permitem avaliar e identificar os defeitos da coagulação, fornecendo ao clínico informações preciosas para o diagnóstico e monitorização da terapêutica anticoagulante. Os testes utilizados na avaliação laboratorial da hemostase classificam-se em funcionais (determinam a actividade das proteínas a maior parte das vezes por coagulometria ou turbidimetria) e imunológicos (detectam a presença das proteínas com base em anticorpos específicos por imuno-ensaios).

O Tempo de Protrombina (TP) e o Tempo de Tromboplastina Parcial Activado (TTPA) são dois testes coagulométricos rotineiramente utilizados na avaliação inicial da hemostase. O TP determina o tempo que um plasma citratado pobre em plaquetas demora a coagular, após adição do factor tromboplastina tecidual e de cálcio. Avalia a via extrínseca e comum da coagulação. O TTPA é o tempo que um plasma citratado pobre em plaquetas demora a coagular após adição de um

activador dos factores de contacto, cálcio e fosfolípidos. É um teste que avalia a eficiência das vias intrínseca e comum da coagulação (Figura 5).

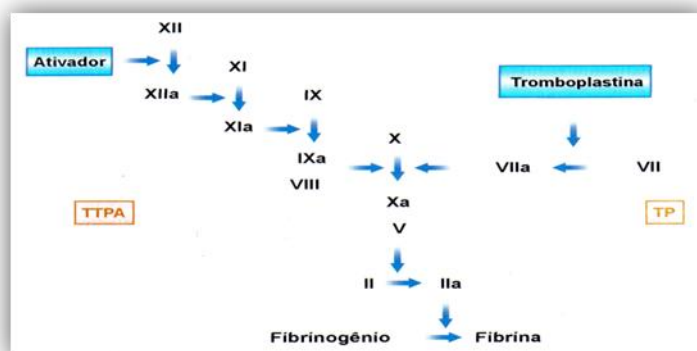


Figura 5 - Factores da coagulação avaliados pelo TTPA e TP (2).

Os resultados dos tempos de coagulação podem ser alterados por vários factores (fármacos, deficiência de factores, presença de inibidores). Tempos de coagulação prolongados devem repetir-se, misturando partes iguais de plasma normal com plasma do doente. Em caso de deficiência de factores o tempo de coagulação é corrigido pela adição de plasma normal (que repõe os factores em falta no plasma da amostra). Contudo, o mesmo não acontece se o prolongamento do tempo de coagulação for devido à presença de inibidores. O presente trabalho aborda um inibidor que prolonga *in vitro* as provas da coagulação dependentes de fosfolípidos: o Inibidor Tipo Lúpus ou Anticoagulante Lúpico (AL). Na clínica, este inibidor, está associado em particular ao Síndrome Anti-fosfolípido (SAF).

1.3 Síndrome anti-fosfolípido

O SAF é considerado uma alteração do sistema imunológico, englobada no grupo das doenças auto-imunes, caracterizada por eventos trombóticos em associação com a presença, no sangue, de auto-anticorpos dirigidos contra os fosfolípidos ou proteínas plasmáticas aderentes aos fosfolípidos (anticorpos anti-fosfolípidos),

fundamentalmente os anti-cardiolipina, anticoagulante lúpico e anti- β 2 glicoproteína I (9).

1.3.1 Anticorpos anti-fosfolípidicos

Os Anticorpos Anti-Fosfolípidicos (AAF) são um grupo muito heterogéneo de imunoglobulinas IgG e/ou IgM, que se desenvolvem espontaneamente ou como consequência de doenças imunes, dirigidas contra fosfolípidos de carga negativa ou contra fosfolípidos unidos a proteínas plasmáticas (protrombina e β 2-glicoproteína I).

Em 1990, três grupos de investigadores independentes uns dos outros, descobriram que os anticorpos anti-cardiolipinas necessitam de uma proteína denominada β 2-Glicoproteína I (β 2GPI) para poderem fixar-se à cardiolipina. Desde então, muitos outros co-factores foram identificados e analisados (a α 2-glicoproteína I, anexina V, protrombina, proteína C, proteína S, factor H, complemento 4, cininogénio, factor XI, e a precalicreína) (10-12). Estima-se que 1-5% dos indivíduos saudáveis, da população mundial tenham anticorpos anti-fosfolípidicos (13).

Clinicamente, a identificação destes auto-anticorpos coloca o problema no campo das patologias auto-imunes, permitindo o acesso a tratamentos mais específicos e altamente eficazes. São considerados anticorpos não patogéneos os dirigidos contra fosfolípidos puros. Estes ocorrem classicamente na sífilis, podendo também surgir noutras doenças infecciosas tais como a malária, síndrome da imunodeficiência humana, hepatite C, *leishmaniose* e vírus do *Epstein-Barr* (11). Os anticorpos anti-fosfolípidicos com importância clínica, e, por isso, os mais frequentemente pesquisados em laboratório de rotina são: os anticorpos anti-cardiolipinas, anticoagulante lúpico e anti- β 2 glicoproteína I. Destes, como já referido anteriormente, o presente trabalho aborda o anticoagulante lúpico.

1.3.2 Anticoagulante lúpico

Considerado um inibidor adquirido da coagulação, o anticoagulante lúpico, prolonga *in vitro* os tempos de coagulação dependentes de fosfolípidos, por neutralização dos fosfolípidos dos reagentes utilizados em hemostase. Paradoxalmente, *in vivo*, a sua presença está associada a quadros clínicos de trombozes venosas e/ou arteriais, com necessidade de tratamento anticoagulante específico (14-15).

O seu efeito anticoagulante, *in vitro*, foi descrito pela primeira vez em 1946 em pacientes com púrpura trombocitopénica imune. A sua associação frequente, que lhe valeu o nome, com Lúpus Eritematoso Sistémico (LES) foi citada por *Conley* e seus colaboradores entre 1948-1952, em pacientes com *Veneral Disease Research Laboratory* (VDRL) falsamente positiva, mas sempre com definição hemorrágica, tal como esperado por um anticoagulante (12). No entanto, em 1963 *Bowie* e outros, descreveram quatro casos de LES com trombose, apesar da presença de um inibidor da coagulação, mais tarde, em 1972, denominado de anticoagulante lúpico. Esta foi a primeira afirmação clara do paradoxo deste anticorpo. Em 1983 associou-se definitivamente a presença do AL com trombose (11, 16).

Este inibidor está fortemente associado a diagnósticos de SAF, LES, trombozes venosas e arteriais e abortos de repetição, entre outras manifestações clínicas das quais se podem destacar: linfoma, púrpura trombocitopénica imune, *livedo reticulares*, atrasos de crescimento intra-uterino, anemia hemolítica, hipertensão pulmonar, síndrome de *Raynaud*, cefaleias, epilepsia e mielite transversa (17).

A correlação entre trombose *in vivo* e o prolongamento dos tempos de coagulação *in vitro*, é uma característica marcante deste anticorpo. Não estão definidos, porém, os mecanismos exactos pelos quais os anticorpos anti-fosfolípidicos actuam. Existem no entanto, algumas hipóteses que tentam explicar o mecanismo pelo qual os anticorpos circulantes reagem com os fosfolípidos intracelulares.

1.3.3 Mecanismos de acção dos anticorpos anti-fosfolípidicos

A maioria dos componentes do sistema hemostático parece estar envolvida na patogenezidade dos AAF, incluindo a cascata da coagulação, a activação e a agregação plaquetar. A interferência em qualquer um desses elementos pode ser um possível mecanismo de alteração hemostática: diminuição da actividade das proteínas C, S e antitrombina III, indução de apoptose, interferência com a função de outros inibidores da coagulação como anexinas e β 2-Glicoproteína (14, 17-20). Tais alterações geram quadros clínicos que caracterizam o SAF.

1.3.4 Aspectos clínicos do síndrome anti-fosfolípido

O SAF apresenta um conjunto muito vasto de manifestações clínicas que resultam da elevada heterogeneidade dos AAF, estando mesmo, algumas dessas manifestações, mais associadas a determinado tipo de anticorpos anti-fosfolípidicos (21). No entanto, encontra-se descrito na literatura como SAF do anticorpo negativo, casos onde não há identificação desses anticorpos no momento do evento trombótico (22). Ocorre mais frequentemente no sexo feminino devido à sua associação com o LES e outras doenças do tecido conjuntivo, que também apresentam uma maior incidência nas mulheres.

As manifestações clínicas mais frequentes são as trombozes venosas e arteriais e os abortos de repetição, entre outras (manifestações hematológicas, dermatológicas, cardíacas, neurológicas e renais). Pode ainda ocorrer como síndrome anti-fosfolípido catastrófico ou associado a outras doenças auto imunes, frequentemente com o LES.

1.3.4.1 Tromboses venosas e arteriais

A trombose é entendida como um desequilíbrio da hemostase, que conduz à formação de um coágulo de fibrina no interior de um vaso sanguíneo, arterial e/ou venoso. É provavelmente a manifestação clínica mais frequente nos pacientes com SAF, tendo estes, muitas vezes, necessidade de recorrerem a terapia anticoagulante específica. Os eventos trombóticos, relacionados com o SAF, estão presentes em quase toda a árvore vascular, sendo as veias superficiais e profundas dos membros inferiores os locais mais frequentes de trombose venosa, e o acidente vascular cerebral isquêmico, a forma mais comum de trombose arterial, observada nos pacientes portadores de anticorpos anti-fosfolípidicos. A avaliação diagnóstica do paciente para determinar a causa de distúrbios trombóticos deve incluir, a pesquisa laboratorial de AAF (19, 23-24).

1.3.4.2 Abortos de repetição

As mulheres com anticorpos anti-fosfolípidicos têm 50% de hipótese de apresentarem abortos de repetição. Estes, são facilmente explicados pela ocorrência de trombozes placentárias. Os anticorpos anti-fosfolípidicos também podem estar associados com o aumento na incidência de complicações obstétricas e pós-natais, incluindo a pré-eclâmpsia, sofrimento fetal, atraso do crescimento intra-uterino, parto prematuro e eventos trombóticos maternos no período pós-parto (19-20).

1.3.4.3 Manifestações hematológicas

As alterações hematológicas no SAF incluem a trombocitopenia (geralmente moderada sem a ocorrência de hemorragia) e a anemia hemolítica auto-imune (ocorre em cerca de 30% dos pacientes com esta patologia) (19).

1.3.4.4 Manifestações dermatológicas

As manifestações dermatológicas no SAF incluem o *livedo reticularis*, tromboflebitides superficiais, úlceras cutâneas dos membros inferiores, piodermides, cianose distal dos dedos, e necrose cutânea generalizada (19).

1.3.4.5 Manifestações cardíacas

As anormalidades cardíacas são comuns nos pacientes com SAF, sendo caracterizadas pela presença de vegetações, regurgitação e estenose valvulares. A insuficiência valvular, a trombose das artérias coronárias e a endocardite de *Libman-Sacks* também podem ocorrer (19).

1.3.4.6 Manifestações neurológicas

As anomalias neurológicas associadas aos AAF, mais frequentes, incluem acidentes isquêmicos cerebrais, transitórios e acidentes vasculares, cerebrais, isquêmicos, não embólicos, doenças obstrutivas dos vasos da retina, cefaleias, síndrome de *Sneddon*, convulsões, mielite transversa e neurite óptica (19).

1.3.4.7 Manifestações renais

Normalmente, ocorrem oclusões vasculares, manifestando-se através de hipertensão arterial, perda insidiosa da função renal (mesmo na ausência da proteinúria) e dor abdominal por enfarte renal ou trombose da veia renal (19).

1.3.4.8 Síndrome anti-fosfolípido catastrófico

É uma manifestação séria e muitas vezes fatal, caracterizada por enfartes disseminados, desenvolvidos em dias ou semanas, com falência orgânica múltipla dos órgãos (25-26). A maioria dos pacientes com esta manifestação relata uma história de LES leve ou inactivo com ou sem história anterior de SAF, e apresentam títulos de anti-cardiolipina IgG elevados e AL positivo. Um factor precipitante, tal como uma infecção viral, utilização de medicamentos ou o período pós-parto, pode estar presente em alguns casos (19).

1.3.4.9 Lúpus eritematoso sistémico

O Lúpus Eritematoso Sistémico é considerado uma doença pleiomórfica, de etiologia desconhecida, caracterizada pela produção de auto-anticorpos não específicos dirigidos contra antígenos nucleares. Ocorre predominantemente nas mulheres jovens em idade reprodutiva (27). Um estudo recente, realizado em Portugal, demonstrou que certos componentes na família dos genes *Human Leukocyte Antigen* (HLA) determinam uma maior probabilidade de desenvolver lúpus, enquanto outros revelam um efeito protector (28). A presença de AAF nos doentes com LES faz com que estes desenvolvam frequentemente SAF. Consequentemente, os mesmos apresentam algumas das manifestações clínicas anteriormente referidas, das quais se destacam as trombozes e os abortos de repetição (19).

Com um tão vasto conjunto de alterações clínicas e laboratoriais, nem sempre é fácil diagnosticar SAF, surgindo assim a necessidade de estabelecer critérios de avaliação diagnóstica.

1.3.5 Avaliação diagnóstica do síndrome anti-fosfolípido

O diagnóstico do SAF é baseado em critérios internacionais de classificação. Estes, foram actualizados em 2006 (29) com base nos conhecimentos clínicos, laboratoriais e experimentais acumulados desde a sua formulação em 1998 (*Sapporo*) (30). De acordo com as actuais orientações, deve estar presente, pelo menos um dos seguintes critérios clínicos e um outro laboratorial, para se diagnosticar SAF:

Crítérios clínicos:

- Trombose vascular (um ou mais episódios de trombose venosa, arterial ou dos pequenos vasos, em qualquer tecido ou órgão. Deve ser confirmada por estudos de imagem ou histopatologia). No caso de confirmação histopatológica, a trombose deve estar presente sem evidências significativas de inflamação na parede do vaso.
- Complicações na gravidez (morte inexplicada de fetos morfologicamente normais, depois da décima semana de gestação; nascimentos prematuros de recém-nascidos morfologicamente normais antes da trigésima quarta semana de gestação; três ou mais abortos espontâneos antes da décima semana de gestação, depois de excluídas todas as causas de anormalidades cromossómicas, morfológicas e hormonais).

Crítérios Laboratoriais:

- Presença de Anticoagulante Lúpico, em duas ou mais ocasiões, com pelo menos doze semanas de intervalo, detectado de acordo com as recomendações da Sociedade Internacional de Trombose e Hemostase – Subcomité de Anticoagulante Lúpico/Anticorpos Anti-Fosfolípidicos (31)
- Presença do anticorpos anti-cardiolipinas de isotipo IgG e/ou IgM, em duas ou mais ocasiões, com pelo menos doze semanas de intervalo, detectados por um

teste de Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay (ELISA) padronizado e de acordo com os procedimentos recomendados (32-34).

- Presença do anticorpos anti- β_2 glicoproteína I de isotipo IgG e/ou IgM, em duas ou mais ocasiões, com pelo menos doze semanas de intervalo, detectados por um teste de ELISA padronizado e de acordo com os procedimentos recomendados (35).

Os resultados laboratoriais só podem ser valorizados a partir da décima segunda semana após o evento clínico (e nunca mais de 5 anos depois) caso contrário o evento pode produzir um resultado falso positivo.

Assim, o diagnóstico laboratorial de SAF engloba a pesquisa de anticorpos anti-cardiolipinas, anti- β_2 glicoproteína I e anticoagulante lúpico. O presente trabalho aborda a pesquisa laboratorial do anticorpo anticoagulante lúpico.

1.3.6 Detecção laboratorial do anticoagulante lúpico

São inúmeras as variáveis que podem afectar os ensaios laboratoriais na detecção de AL. Entre elas, o conteúdo e tipo de fosfolípidos dos reagentes, o activador, a preparação do plasma, a expressão dos resultados e os valores de *cut-off* influenciam fortemente os resultados. Além disso, as incertezas sobre os seus mecanismos de acção aliadas ao largo espectro de anticorpos e á ampla variação da especificidade dos seus epitopos, continua a ser a maior dificuldade na obtenção de material de referência. Como consequência, é descrita uma grande variabilidade no desempenho dos laboratórios clínicos, no que diz respeito à sensibilidade e especificidade dos testes utilizados na detecção do AL (36-38), pelo que, as taxas de falsos positivos e falsos negativos continuam relativamente altas. Os primeiros merecem especial atenção, dado que sujeitam os pacientes a terapias anticoagulantes orais longas e desnecessárias (39).

Com tantas variáveis a influenciar os resultados dos testes AL, tornou-se necessário estabelecer critérios de orientação. Em 1995, o Subcomité de

Anticoagulante Lúpico/Anticorpos Anti-Fosfolípidicos, efectuou uma revisão dos critérios de orientação da detecção laboratorial do AL (40) os quais, foram recentemente revistos e publicados (2009) (31)(Anexo I). O actual Subcomité reconheceu que as orientações, publicadas em 1995, foram extremamente úteis, no entanto, considerou apropriado fornecer detalhes adicionais e especificações à luz dos novos conhecimentos e experiência acumulada. Destas destaca-se a colheita e preparação da amostra, a selecção dos pacientes, os testes utilizados, e a expressão dos resultados.

1.3.6.1 Colheita e preparação da amostra

A colheita de sangue deve ser feita para tubos com citrato de sódio, na proporção de 9:1, e efectuada antes do inicio de qualquer droga anticoagulante ou num período após a sua suspensão.

A detecção laboratorial do anticoagulante lúpico passa inevitavelmente pela preparação adequada das amostras. As plaquetas residuais dos plasmas afectam os testes de coagulação dependentes de fosfolípidos. Através da exposição dos fosfolípidos aniónicos das suas membranas encurtam falsamente os tempos de coagulação. Tal interferência é mais evidente em amostras submetidas a processos de congelamento (-70°C) e descongelamento antes da análise (18, 41). Para a remoção das plaquetas residuais do plasma recomenda-se a dupla centrifugação das amostras (3000 rpm durante quinze minutos). A utilização filtros é desaconselhada, dado que introduz variáveis que podem influenciar o teste, tais como, o tipo de filtro, perda do factor de *von Willbrand* e custos adicionais (42).

1.3.6.2 Selecção dos pacientes

Devem apenas ser sujeitos a testes para pesquisa de AL, os pacientes com grande probabilidade de ter SAF, ou os que tenham um TTPA, de rotina,

inexplicavelmente alongado. Nos pacientes com teste positivo é imperativo a repetição do teste doze semanas após o teste inicial, para confirmação de SAF, uma vez que o AL pode surgir transitoriamente (31).

1.3.6.3 Testes para a detecção do anticoagulante lúpico

Enquanto os anticorpos anti-cardiolipina e anti- β 2-Glicoproteína I, são detectados em laboratório por imuno-ensaios, o diagnóstico laboratorial do AL é baseado em testes funcionais da coagulação, pelo que a terapêutica anticoagulante, pode interferir nos resultados.

O TTPA é considerado o teste de triagem laboratorial deste anticorpo, encontrando-se prolongado na presença do mesmo. Consoante a quantidade, natureza e propriedades físicas dos fosfolípidos utilizados como substitutos das plaquetas, assim os diversos reagentes de TTPA, existentes no mercado, apresentam maior ou menor sensibilidade ao AL (43). O Subcomité de Anticoagulante Lúpico/Anticorpos Anti-Fosfolípidicos recomenda a utilização de um TTPA com sílica como activador. Os reagentes de TTPA que utilizam *Kaolin* e ácido Elágico como activadores, não são aconselhados na triagem do AL devido ao seu comportamento problemático nos analisadores automáticos, e insensibilidade ao AL, respectivamente.

A detecção laboratorial do AL é complementada com o recurso a técnicas mais específicas e sensíveis. Na literatura encontra-se, descrita uma grande diversidade de testes para a detecção do AL (18, 44-48). No entanto, nem todos são recomendados pelo Subcomité de Anticoagulante Lúpico/Anticorpos Anti-Fosfolípidicos do Comité Científico e de Normalização da Sociedade Internacional de Trombose e Hemostase. Historicamente, o Tempo de Veneno da Víbora de *Russel* diluído (TVVRd), descrito pela primeira vez em 1986 (49), é o teste de eleição. Baseia-se na activação do factor X por uma fracção do veneno da víbora de *Russel*, juntamente com fosfolípidos. Outro teste a ser considerado é o *Silica*

Clotting Time (SCT) (45). Este contém sílica como activador, que na presença de cálcio activa directamente a via intrínseca da coagulação (Figura 6).

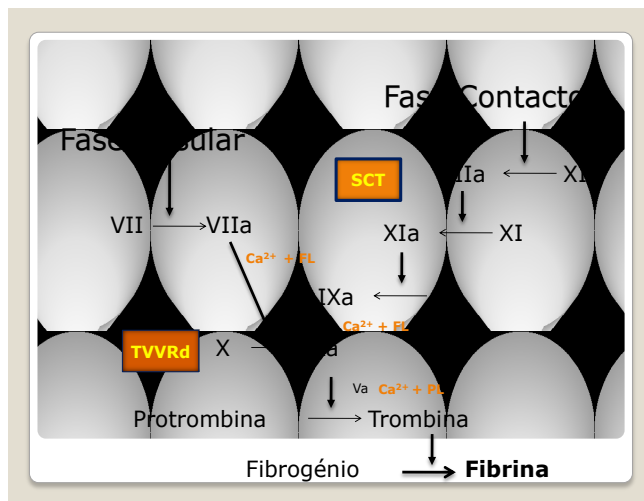


Figura 6 – Mecanismo de acção dos testes TVVRd e SCT na cascata da coagulação. (Ca: cálcio; FL: fosfolípidos). Adaptado da bula dos *kits Silica Clotting Time (Hemosil)* e *Lúpus Anticoagulant (Siemens)*.

Os seguintes testes, embora estejam descritos na literatura, não são recomendados actualmente: tempo de protrombina diluído, devido à variabilidade dos reagentes de tromboplastina existentes no mercado, ensaios baseados em venenos de serpentes como a Ecarina e a Textarina, uma vez que não existem *Kits* comerciais padronizados, e o Tempo de Coagulação *Kaolin*, devido à sua baixa reprodutibilidade, quando comparado com outros testes (48).

Um dos pontos actualizados, pelo actual Subcomité de Anticoagulante Lúpico/Anticorpos Anti-Fosfolípidicos, tem por base o elevado espectro dos anticorpos AL e dos seus epitopos, e consequentemente a não existência, de um teste capaz de detectar todos os tipos de AL. Assim, é recomendada a utilização de duas metodologias em simultâneo, com distintos princípios analíticos e cada uma com diferentes concentrações de fosfolípidos. O primeiro teste a ser considerado é o tempo de veneno da víbora de *Russel* diluído, o segundo é um teste de *Silica Clotting Time* (SCT). Ou seja, na prática laboratorial as amostras devem ser submetidas a quatro testes em simultâneo: TVVRd *screening* e

confirmatório, e SCT *screening* e confirmatório (Figura 6). Sendo que, os ensaios de *screening* possuem baixa concentração de fosfolípidos (os anticorpos AL, presentes nas amostras, reagem com os fosfolípidos prolongando o tempo de coagulação), e os confirmatórios elevada concentração (estes fosfolípidos adicionais neutralizam os anticorpos AL corrigindo, assim, o tempo de coagulação da amostra). Os resultados inicialmente positivos devem ser posteriormente confirmados por teste de mistura. A amostra é considerada positiva para o AL, se um dos dois testes der resultado positivo.

1.3.6.4 Expressão dos resultados

Os resultados podem ser expressos em *ratio* (tempo de coagulação do doente/tempo de coagulação de *pool* de plasmas normais), para todos os procedimentos (*screening*, confirmatório e mistura), sendo o resultado final expresso em *ratio* normalizado e sempre acompanhados de um comentário interpretativo de positivo ou negativo. Um resultado de AL deve sempre ser considerado no contexto laboratorial dos outros AAF. Pois a presença de títulos médios-altos de anti-cardiolipina e anti- β 2-glicoproteína I do mesmo isotipo (geralmente IgG), identificam pacientes de alto risco de trombose (31).

1.4 Enquadramento do tema

A pesquisa de AL, no Laboratório de Hematologia do Serviço de Patologia Clínica, dos Hospitais da Universidade de Coimbra (HUC), é efectuada através de um teste de triagem (TTPA contendo sílica como activador) e por um outro mais específico (TVVRd *screening*, confirmatório, e respectivas misturas caso necessário). Com base nas novas orientações do Subcomité de Anticoagulante Lúpico/Anticorpos Anti-Fosfolípidicos do Comité Científico e de Normalização da Sociedade Internacional de Trombose e Hemostase, publicadas em Dezembro de 2009, as quais recomendam a pesquisa do AL por dois métodos, em simultâneo,

com distintos princípios analíticos (Tempo de veneno da víbora de *Russel* diluído e *Sílica Clotting Time*) e diferentes concentrações de fosfolípidos, considerou-se oportuno a realização deste trabalho, utilizando pela primeira vez o *kit Sílica Clotting Time (Hemosil)* no Laboratório de Hematologia do Serviço de Patologia Clínica dos Hospitais da Universidade de Coimbra, EPE.

1.5 Objectivos

Os objectivos do presente trabalho são os seguintes:

- Avaliar o comportamento de dois reagentes comerciais, Lupus Anticoagulant (LA) da *Siemens* (TVVRd) e *Sílica Clotting Time* da *Hemosil* (SCTH), na detecção do AL, para possível implementação futura deste último.
- Verificar se a percentagem de casos AL positivos aumenta, quando comparada apenas com a utilização do teste LA (*Siemens*).
- Estabelecer orientações de utilização, na rotina do serviço, dos dois testes disponíveis.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Caracterização da população em estudo

O presente estudo incidiu sobre um grupo de 152 pacientes, seguidos em diversos Serviços dos Hospitais da Universidade de Coimbra, EPE, aos quais, foi solicitado pelo médico assistente e de acordo com a história clínica (Tabela 1), a determinação analítica do TTPA e pesquisa da presença de anticoagulante lúpico (Reumatologia-26; Hematologia-70; Dermatologia-4; Medicina Interna-14; Neurologia-16; Psiquiatria-2; Oftalmologia-1; Gastrenterologia-2; Obstetrícia-12; Cirurgia Vascular-1; Pneumologia-4). Destas, 94 eram de pacientes do sexo feminino e 58 do sexo masculino, com idades compreendidas entre os 14 e os 87 anos, média de 46 anos.

Tabela 1 - Informação clínica da população em estudo.

Informação clínica	Número de casos
Trombofília	58
LES	22
SAF	7
Abortos de repetição	12
Acidente vascular cerebral	8
Cefaleias	1
Livedo reticularis	1
Tromboembolia pulmonar	3
Trombose venosa profunda	2
Doença autoimune	1
Hipertensão pulmonar	1
Síndrome mielodisplásico	1
Linfoma	1
Síndrome de Sjogren primário	1
Hipertensão arterial	1
Pancitopenia em estudo	1
Sem informação clínica	31
Total	152

Foram ainda analisadas duas amostras de controlo de qualidade externo, *United Kingdom National External Quality Assessment Service (UK NEQAS)*, o que perfaz um total de 154 amostras estudadas.

Além da população em estudo utilizaram-se 10 amostras de dadores de sangue (população considerada normal) para a determinação dos valores de normalidade do SCTH. O presente estudo decorreu no período compreendido entre o dia 9 de Março e 10 de Agosto de 2010.

A componente laboratorial do estudo foi executada diariamente no Laboratório de Hematologia do Serviço de Patologia Clínica dos Hospitais da Universidade de Coimbra, EPE, com consentimento do Director de serviço.

2.2 Material biológico

As amostras de sangue periférico foram recolhidas por punção venosa, nos respectivos internamentos e na sala de colheitas do laboratório, para tubos de vácuo contendo citrato de sódio a 3,8% (*Vacurette*). Após a colheita, as amostras foram mantidas à temperatura ambiente, sendo posteriormente enviadas para o Laboratório de Hematologia, onde foram tratadas e processadas o mais rápido possível.

2.3 Reagentes

Calibration Plasma (Hemosil): reagente comercial liofilizado, que contém plasma humano citratado, preparado a partir de *pool* de plasmas de dadores de sangue, tampão, excipientes e conservantes. Foi utilizado como plasma normal nos testes de mistura e como controlo dos tempos de coagulação (TP, TTPA, TVVR SCT), segundo as orientações do fabricante.

PT-Fibrinogen HS Plus (Hemosil): este reagente contém tromboplastina de cérebro de coelho com estabilizadores, polibrene (inibidor da heparina) e tampão. Foi utilizado na determinação analítica do TP, segundo as orientações do fabricante.

APTT-SP liquid (Hemosil): os reagentes do *kit APTT-SP liquid* contêm, de entre outros, sílica coloidal em dispersão com fosfolípidos sintéticos e cloreto de cálcio. A sílica estimula a produção do factor XIIa, e o cloreto de cálcio promove as reacções posteriores que conduzem à formação de coágulo. Foi utilizado na determinação analítica do TTPA, segundo as orientações do fabricante.

LA 1 e LA 2 (SIEMENS): reagentes comerciais liofilizados que contêm, entre outros, fosfolípidos, cálcio e veneno da víbora de Russell. Este último activa directamente o factor X da amostra, desencadeando assim a formação de coágulo. Na presença de anticorpos AL, os mesmos neutralizam os fosfolípidos e prolongam o tempo de coagulação do reagente de rastreio LA1. O reagente de confirmação (LA2) possui uma concentração superior de fosfolípidos relativamente ao reagente LA 1. Estes fosfolípidos adicionais reagem com os anticorpos AL corrigindo, assim, largamente o tempo de coagulação da amostra. Para excluir a deficiência de factores, em amostras inicialmente positivas, adicionou-se plasma normal ao de teste, na proporção 1:1. Tempos de mistura prolongados confirmam a positividade do teste inicial. Estes reagentes foram utilizados na detecção do AL como teste de *screening* (LA 1) e confirmatório (LA 2), segundo as orientações do fabricante.

Sílica Clotting Time (HemosIL): os reagentes deste Kit contêm, entre outros, sílica coloidal em dispersão, fosfolípidos sintéticos e cloreto de cálcio. A sílica na presença de cálcio activa directamente a via intrínseca da coagulação, conduzindo à formação de coágulo. O SCT *Screen* possui uma concentração baixa de fosfolípidos, o que faz com que o reagente seja altamente sensível à presença do AL, alargando o tempo de coagulação na presença deste. Uma alta concentração de fosfolípidos no SCT *Confirm* neutraliza o AL e encurta os tempos

de coagulação. Estes reagentes foram utilizados na detecção do AL (teste de *screening* e confirmatório), segundo as orientações do fabricante.

2.4 Preparação das amostras de sangue periférico

As amostras de sangue foram duplamente centrifugadas, durante quinze minutos a 3000 rpm numa centrífuga (*Jouan GR422*) refrigerada a 16^o C, de modo a obter plasma pobre em plaquetas, no qual, se efectuou a determinação analítica do TTPA, do TVVRd (*screening* e confirmatório), e do SCT (*screening* e confirmatório). As amostras de doadores de sangue foram tratadas de igual forma, e efectuou-se nestas a determinação analítica do TP, TTPA e SCT (*screening* e confirmatório). Para o efeito utilizou-se o analisador de coagulação ACL TOP 700 da *Instrumentation Laboratory* (número de série-07010683), segundo as orientações do fabricante. Este aparelho mantém as amostras à temperatura ambiente, os reagentes a 16^o C e incuba os ensaios a 37^o C.

2.5 Determinação dos valores de normalidade *SCT Screen* e *SCT Confirm*

Em dez amostras de plasma citratado, provenientes de doadores de sangue, efectuou-se inicialmente a determinação analítica do TP e do TTPA, com vista a confirmar que os tempos de coagulação se encontravam dentro dos valores normais (estipulados pelo serviço). De seguida, efectuou-se nas mesmas, a determinação dos tempos de *SCT Screen* e *SCT Confirm*. A média dos resultados obtidos em cada teste correspondeu ao valor de normalidade, respectivamente. Estes valores foram introduzidos no *software* do analisador da coagulação, para o cálculo dos *ratios* de acordo com as seguintes equações:

$$\text{Ratio do SCT Screen} = \frac{\text{Resultado do doente (segundos)}}{\text{Valor de normalidade SCT Screen (segundos)}}$$

$$\text{Ratio do SCT Confirm} = \frac{\text{Resultado do doente (segundos)}}{\text{Valor de normalidade SCT Confirm (segundos)}}$$

$$\text{Ratio Normalizado} = \frac{\text{Ratio SCT Screen}}{\text{Ratio SCT Confirm}}$$

O teste TVVRd já se encontrava implementado no Laboratório de Hematologia do Serviço de Patologia Clínica dos Hospitais da Universidade de Coimbra, a determinação dos valores de normalidade foi em tudo semelhante ao teste SCT.

2.6 Expressão dos resultados e valores de referência

Os resultados foram expressos em segundos, para o TTPA (intervalo normal compreendido entre 26 a 30 segundos), e em *ratio* normalizado para os testes do TVVRd e SCT, acompanhado de um comentário interpretativo de positivo ou negativo. Amostras com *ratio* normalizado inferior ou igual a 1,20 foram consideradas como negativas para AL, e positivas se *ratio* normalizado superior a 1,20.

2.7 Análise estatística

Utilizou-se o teste de diagnóstico para determinar a precisão, a especificidade e a sensibilidade dos dois testes. Considerou-se um $\alpha < 0,05$ para a interpretação da significância estatística. Utilizou-se o teste *Kappa de Cohen* para a determinação de concordância entre os dois testes ($Kappa \leq 0.2 \rightarrow$ Concordância Fraca; $0.2 < Kappa \leq 0.4 \rightarrow$ Concordância Moderada; $0.4 < Kappa \leq 0.6 \rightarrow$ Concordância Boa; $0.6 < Kappa \leq 0.8 \rightarrow$ Concordância Muito Boa; $0.8 < Kappa \leq 1 \rightarrow$ Concordância Excelente).

3. RESULTADOS

Das 154 amostras estudadas, 23 foram consideradas positivas, e 131 foram consideradas negativas. Destas, 131 foram negativas em ambos os testes (B), 19 foram positivas nos dois testes (C), 4 foram positivas só no teste SCT (D) e não se obtiveram amostras positivas só com o teste LA (A) (Figura 7). Efectuaram-se 47 testes de mistura no teste LA e nenhum no teste SCT.

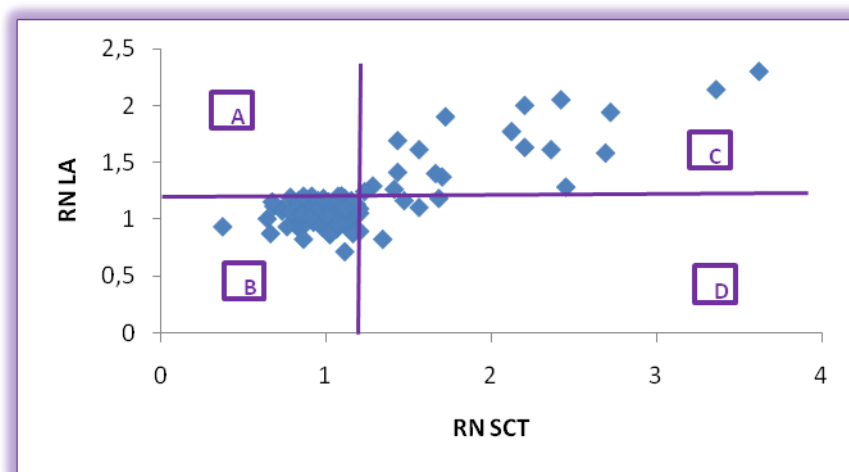


Figura 7 - *Ratios* normalizados obtidos nos testes LA e SCT. (RN LA: *ratios* normalizados obtidos com o teste LA; *ratios* normalizados obtidos com o teste SCT).

Das amostras positivas 10 eram de doentes com LES, 7 de doentes com Trombofília, 3 de doentes com abortos de repetição, 2 de doentes com SAF e 1 de doente com uma doença auto-imune (Figura 8). As 4 amostras positivas apenas com o teste SCT pertencem ao grupo de doentes com Trombofília.

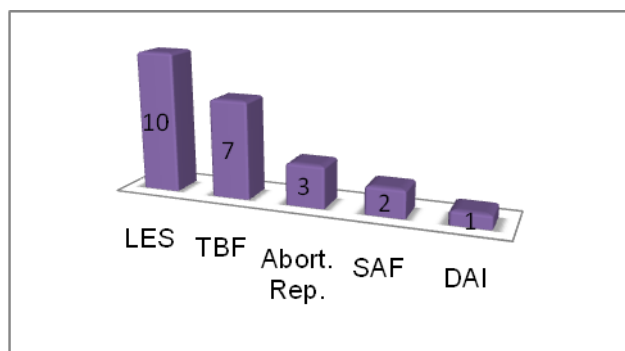


Figura 8 – Informação clínica dos doentes com amostras positivas. (TBF: Trombofilia; Abort. Rep.: abortos de repetição; DAI: Doença Auto Imune).

O grau de concordância entre os dois testes, obtido pelo teste Kappa de Cohen foi de 0,89.

As Tabelas 2 e 3 apresentam os resultados da análise estatística do teste diagnóstico:

Tabela 2 - Resultados da análise estatística do teste diagnóstico, tendo como padrão de ouro o teste LA.

	PE	IC-	IC+	α
Precisão	97%	95%	100%	0,0251218
Sensibilidade	100%	100%	100%	0
Especificidade	97%	94%	100%	0,0286036

Tabela 3 – Resultados da análise estatística realizada com o teste diagnóstico, tendo como padrão de ouro o teste SCT.

	PE	IC-	IC+	α
Precisão	97%	95%	100%	0,0251218
Sensibilidade	83%	67%	98%	0,154907
Especificidade	100%	100%	100%	0

(IC-: Intervalo de confiança mínima; IC+: Intervalo de confiança máximo; PE: percentagem estatística).

4. DISCUSSÃO

O AL ganhou um interesse considerável, entre a clínica e o laboratório, baseado na observação de Bowie e outros, em 1963, a qual associava a positividade deste anticorpo com a possível ocorrência de trombose (50). Estudos posteriores confirmaram essa associação, sendo que actualmente testes AL persistentemente positivos em doentes com história recente de trombose ou abortos de repetição, são classificados com tendo SAF (29) e têm muitas vezes necessidade de recorrer a terapias anticoagulantes longas. A anticoagulação a longo prazo não é desprovida de risco hemorrágico, pelo que, a detecção laboratorial do AL, desempenha um papel crucial no que diz respeito à tomada de decisão sobre se e quanto tempo o doente é sujeito a anticoagulantes. Contudo, a elevada heterogeneidade destes anticorpos e as incertezas sobre os seus mecanismos de acção, dificultam a obtenção de material de referência necessário para a sua detecção. Consequentemente não existe disponível no mercado um teste sensível a todos os tipos de AL. No entanto, existem critérios de orientação simplificados mas extremamente úteis, elaborados pelo Subcomité de Anticoagulante Lúpico/Anticorpos Anti-Fosfolípidicos do Comité Científico e de Normalização da Sociedade Internacional de Trombose e Hemostase (2009), que ajudam os laboratórios a dar uma resposta fiável. Estas orientações, requerem o prolongamento de um ou mais testes de coagulação dependentes de fosfolípidos, prova de que o mesmo se deve à presença de inibidor e não há deficiência de factores e prova de que é dirigido contra fosfolípidos de carga negativa e não contra um determinado factor. Para tal, o Subcomité aconselha a realização de um teste de triagem (TTPA), teste mistura do TTPA, e dois testes específicos realizados em simultâneo (TVVRd e SCT), respectivamente. Com base nestas orientações avaliou-se o comportamento de dois reagentes comerciais, LA da Siemens (TVVRd) e Sílica Clotting Time da Hemosil, na detecção do AL, em 154 amostras. Destas, 131 foram consideradas negativas e 23 positivas. Os diagnósticos dos doentes com amostras positivas (Figura 8) estão de acordo com a literatura. Da observação da figura 9, pode dizer-se que os dois testes foram

concordantes em 131 amostras negativas (B) e em 19 positivas (C). No entanto, o SCTH detectou 4 amostras positivas que o LA considerou negativas (D). A literatura justifica esta diferença, pela elevada heterogeneidade dos anticorpos AL, indo de encontro ao critério que originou este trabalho, definido pelo Subcomité de Anticoagulante Lúpico/ Anticorpos Anti-Fosfolípidicos (18, 31, 36-38, 43-45). Mesmo assim, estatisticamente, os dois testes apresentam um grau de concordância de 0,89, o que revela ser uma concordância excelente. Assim, numa primeira análise, o reagente SCTH sugere ter maior capacidade de detecção do AL, pois detectou todos os casos positivos do teste LA e mais 4. Enquanto o teste LA não detectou nenhuma amostra positiva que fosse negativa no SCT. Assim, uma vez que o TVVRd era o teste já utilizado na rotina do serviço e historicamente considerado o teste de eleição na pesquisa do AL, considerou-se como padrão de ouro e efectuou-se a análise estatística do teste de diagnóstico. Observando a tabela 2, obtivemos uma precisão diagnóstica entre os dois testes de 97%. Como o SCT detectou todos os casos que foram positivos no LA, obteve-se uma sensibilidade de 100%. No entanto, devido à discordância das 4 amostras negativas no teste LA e positivas no teste SCT, este revelou uma especificidade de 97%. Analisando os *ratios* normalizados dessas amostras, verificou-se que eram superiores a 1,4, ou seja são *ratios* claramente positivos e não influenciados pelos valores de cut-off. Além do mais eram amostras provenientes de doentes com trombofilia as quais, tinham anticorpos anti-nucleares positivos (doença auto-imune sistémica), tendo ainda uma delas, anticorpos anti-cardiolipina e anti- β 2-glicoproteína I também positivos. Após esta observação, decidiu-se inverter a relação entre os testes transformando o SCT em padrão de ouro. Com efeito, o teste LA revelou uma sensibilidade de 83% e uma especificidade de 100%, mantendo-se a concordância (97%). No entanto, como a amostragem de casos positivos concordantes e discordantes entre os dois testes é pequena, obteve-se um $\alpha > 0,05$ em alguns parâmetros do teste diagnóstico para ambos os reagentes (Tabela 2 e 3). Tal evidência aponta para a continuação do estudo no sentido de alargar a amostragem e torná-la mais significativa. Verificou-se ainda que das 154 testadas foi necessário efectuar no teste LA 47 testes mistura. De acordo com o fabricante o reagente LA1 e LA 2 têm uma estabilidade de 24 horas

após a reconstituição, o que implica na rotina diária do serviço um desperdício médio de 50% do reagente. No SETH não foi necessário efectuar nenhum teste mistura, e a estabilidade dos reagentes, após reconstituição é cerca de 20 vinte dias, o que torna mais prática a sua utilização. Estas diferentes características implicam custos adicionais (*pool* normal, reagentes, cuvetes...) quando se utiliza o teste LA. Perante estes dados, considera-se oportuno propor a utilização do SETH como reagente de primeira linha na rotina do serviço do Laboratório de Hematologia dos Hospitais da Universidade de Coimbra, EPE.

5. CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS FUTURAS

O *Kit Silica Clotting Time* utilizado pela primeira vez no Laboratório de Hematologia do serviço de Patologia Clínica dos Hospitais da Universidade de Coimbra, EPE, mostrou uma maior capacidade de detecção. Esta característica aliada ao seu menor custo e à sua maior estabilidade apontam para a sua utilização, na rotina do serviço, como reagente de primeira linha na detecção do AL. Mas, dado o reduzido número de casos positivos recomenda-se a continuação do estudo. No entanto, numa análise preliminar dos resultados, podemos concluir que, os reagentes testados revelam uma concordância excelente na detecção do AL. Perante estes dados, e de acordo com as recomendações do Subcomité de Anticoagulante Lúpico/Anticorpos Anti-Fosfolípidicos do Comité Científico de Normalização da Sociedade Internacional de Trombose e Hemostase, considerou-se oportuno propor novos critérios para a detecção do AL na rotina do serviço do Laboratório de Hematologia dos Hospitais da Universidade de Coimbra, EPE, tal como referido a seguir (Figura 9).

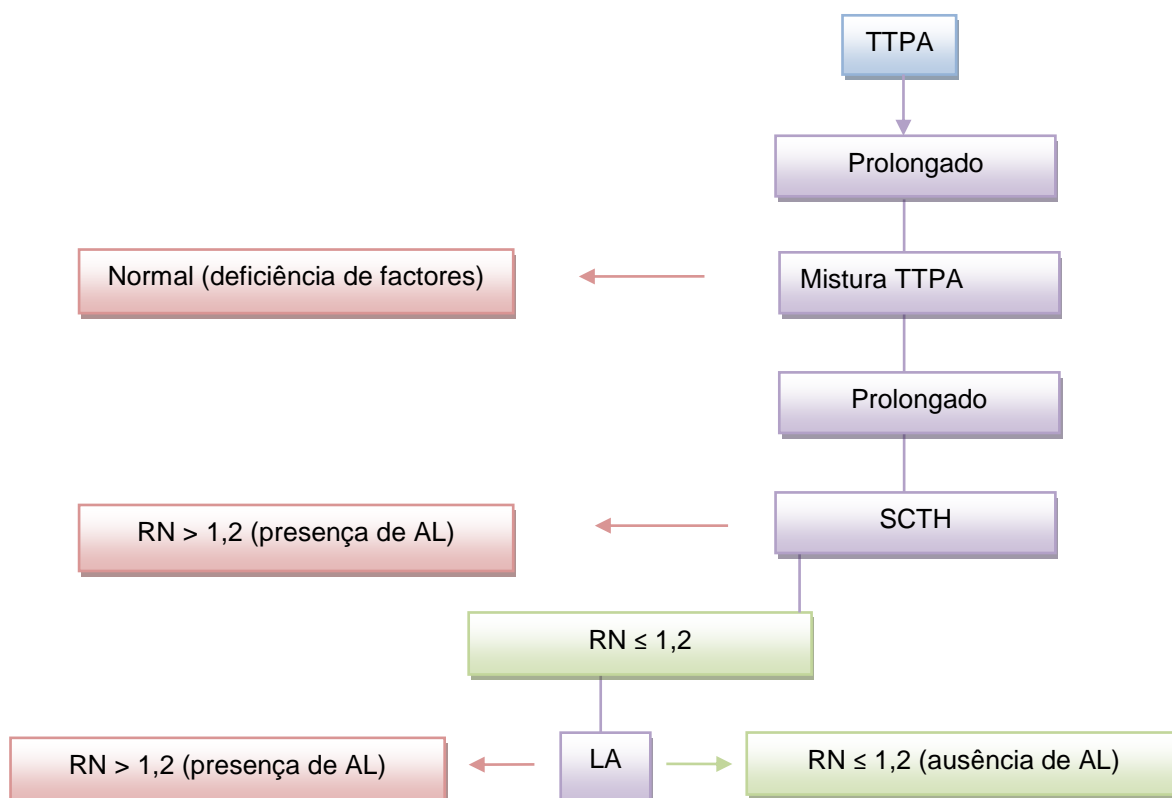


Figura 9 – Esquema de utilização dos reagentes na detecção laboratorial futura do AL.

6. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Hoffbrand A, Pettit J, Moss P. Plaquetas, coagulação do sangue e hemostasia. Fundamentos em Hematologia. 4ª ed. Porto Alegre: Artmed 2004. p. 244-57.
2. Zago M, Falcão R, Pasquini R. Hemostasia normal. Hematologia-Fundamentos e prática 1ª ed. São Paulo: Atheneu; 2004. p. 735-948.
3. Singer S, Nicolson G. The fluid mosaic model of the structure of cell membranes. Science 1972;23:720-31.
4. Kolde H. Primary haemostasis. Haemostasis. Switzerland: Pentapharm 2001. p. 12-34.
5. Davie E, Ratnoff O. Waterfall sequence for intrinsic blood clotting. Science. 1964;145:1310-2.
6. Macfarlane R. An enzyme cascade in the blood clotting mechanism, and its function as a biochemical amplifier. Nature. 1964;202:498-9.
7. Lourenço D. Mecanismos envolvidos na formação do trombo. Revista da Sociedade de Cardiologia do Estado de São Paulo. 1997;3:333-9.
8. Hougie C. The waterfall-cascade and autoproteolysis hypotheses of blood coagulation: personal reflections from an observer. Journal of Thrombosis and Haemostasis. 2004;2:1225–33.
9. Rodrigues C, Carvalho J. Multiple mononeuropathy secondary to thrombosis of the vasa nervorum in primary antiphospholipid syndrome. The Israel Medical Association Journal. 2010;12:448-9.
10. Roubey R, Pratt C, Buyon J, Winfield J. Lupus anticoagulant activity of autoimmune antiphospholipid antibodies is dependent upon beta 2-glycoprotein I. The Journal of Clinical Investigation. 1992;90:1100-4.
11. Horstman L, Wenche J, Bidot C, Ahn Y, Kelley R, Zivadinov R, et al. Antiphospholipid antibodies:Paradigm in transition. Journal of Neuroinflammation. 2009;6:32-54.
12. Sarno M, Couto E, Simoni R, Barini R. Dopplervelocimetria de artérias uterinas e Síndrome Antifosfolipide. Revista de Ciências Médicas. 2006;15:151-7.

13. Belilos E, Carsons S. Antiphospholipid Syndrome. [Web Page] 2009 [29/10/2010]; Available from: <http://emedicine.medscape.com/article/333221-overview>.
14. Laat B, Wu X, Lummel M, Derksen R, Groot P, Rand J. Correlation between antiphospholipid antibodies that recognize domain I of β 2-glycoprotein I and a reduction in the anticoagulant activity of annexin A5. *Journal of the American Society of Hematology* 2007;109:1490-4.
15. Marlar R, Husain S. The enigmas of the lupus anticoagulant: mechanisms, diagnosis, and management. *Current Rheumatology Reports*. 2008;10:74-80.
16. Santamaria J, BadziakII D, MandellIII F, CavalinI L, Sato M. Síndrome antifosfolípide. *Anais Brasileiros de Dermatologia*. 2005;80:225-39.
17. McIntyre J, Wagenknecht D, Faulk W. Antiphospholipid antibodies: discovery, definitions, detection and disease. *Progress in Lipid Research*. 2003;42:176-237.
18. Tripodi A. Laboratory Testing for Lupus Anticoagulants: A Review of Issues Affecting Results. *Clinical Chemistry*. 2007;53:1629–35.
19. Louzada P, Simon S, Voltarelli J, Donaldi E. Síndrome do anticorpo Antifosfolípide. *Medicina*. 1998;31:305-15.
20. Trincani A, Casu C, Cartella S, Ziglioli T, Cattaneo R. Antiphospholipid antibody: laboratory, pathogenesis and clinical manifestations. *Reumatismo*. 2010;62:65-75.
21. Galli M, Luciani D, Bertolini G, Barbui T. Lupus anticoagulants are stronger risk factors for thrombosis than anticardiolipin antibodies in the antiphospholipid syndrome: a systematic review of the literature. *Blood* 2003;101:1827-32.
22. Miret C, Cervera R, Reverter J, Garcia M, Ramos M, Mollà M, et al. Antiphospholipid syndrome without antiphospholipid antibodies at the time of the thrombotic event: transient 'seronegative' antiphospholipid syndrome? *Clinical and Experimental Rheumatology*. 1997;15:541-4.
23. Silver D, Vouyouka A. The caput medusae of hypercoagulability. *Journal of Vascular Surgery*. 2000;31:396-405.
24. Jerrold L, Branch D, Rauch J. The Antiphospholipid Syndrome. *The New England Journal of Medicine*. 2002;346:752-63.

25. Westney G, Harris E. Catastrophic antiphospholipid syndrome in the intensive care unit. *Critical Care Clinics*. 2002;18:805-17.
26. Asherson R, Cervera R, Piette J, Soenfeld Y, Espinosa G, Petri M, et al. Catastrophic antiphospholipid syndrome: clues to the pathogenesis from a series of 80 patients. *Medicine*. 2001;80:355-7.
27. Bertias G, Salmon J, Boumpas D. Therapeutic opportunities in systemic lupus erythematosus: state of the art and prospects for the new decade. *Annals of the Rheumatic Diseases*. 2010;69:1603-11.
28. Vasconcelos C, Carvalho C, Leal B, Pereira C, Bettencourt A, Costa P, et al. HLA in Portuguese Systemic Lupus Erythematosus Patients and Their Relation to Clinical Features. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 2009;1173:575-80.
29. Miyakis S, Lockshin M, Atsumi T, Branch D, Brey R, Cervera R, et al. International consensus statement on an update of the classification criteria for definite antiphospholipid syndrome (APS). *Journal of Thrombosis and Haemostasis*. 2006;4:295-306.
30. Wilson W, Gharavi A, Koike T, Lockshin M, Branch D, Piette J, et al. International consensus statement on preliminary classification criteria for definite antiphospholipid syndrome. *Arthritis & Rheumatism*. 1999;42:1309-11.
31. Pengo V, Tripodi A, Reber G, Rands J, Ortel T, Galli M, et al. Update of the guidelines for lupus anticoagulant detection. Subcommittee on Lupus Anticoagulant/Antiphospholipid Antibody of the Scientific and Standardisation Committee of the International Society on Thrombosis and Haemostasis. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*. 2009;7:1737-40.
32. Wong R, Gillis D, Adelstein S, Baumgart K, Favaloro E, Hendle M, et al. Consensus guidelines on anti-cardiolipin antibody testing and reporting. *Pathology*. 2004;36:63-8.
33. Tincani A, Allegri F, Sanmarco M, Cinquini M, Taglietti M, Balestrieri G, et al. Anticardiolipin antibody assay: a methodological analysis for a better consensus in routine determinations--a cooperative project of the European Antiphospholipid Forum. *Thrombosis and Haemostasis*. 2001;86:575-83.

34. Harris E, Pierangeli S. Revisiting the anticardiolipin test and its standardization. *Lupus*. 2002;11:269-75.
35. Reber G, Tincani A, Sanmarco M, Moerloose P, Boffa M, Antibodies SgotEFoA. Proposals for the measurement of anti-beta2-glycoprotein I antibodies. Standardization group of the European Forum on Antiphospholipid Antibodies. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*. 2004;10:1860-2.
36. Arnout J, Meijer P, Vermeylen J. Lupus anticoagulant testing in Europe: an analysis of results from the first European Concerted Action on Thrombophilia (ECAT) survey using plasmas spiked with monoclonal antibodies against human beta2-glycoprotein I. *Thrombosis and Haemostasis*. 1999;81:929-34.
37. Tripodi A, Biasiolo A, Chantarangkul V, Pengo V. Lupus Anticoagulant (LA) Testing: Performance of Clinical Laboratories Assessed by a National Survey Using Lyophilized Affinity-purified Immunoglobulin with LA Activity. *Clinical Chemistry*. 2003;49:1608-14.
38. Jennings I, Kitchen S, Woods T, Preston F, Greaves M. Potentially clinically important inaccuracies in testing for the lupus anticoagulant: an analysis of results from three surveys of the UK National External Quality Assessment Scheme (NEQAS) for Blood Coagulation. *Thrombosis and Haemostasis*. 1997;77:934-7.
39. Pengo V, Biasiolo A, Gresele P, Marongiu F, Erba N. On behalf of participating centers of Italian Federation of Thrombosis Centers (FCSA). Survey on lupus anticoagulant diagnosis by central evaluation of positive plasma samples. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*. 2007;5:925-30.
40. Brandt J, Triplett D, Alving B, Scharrer I. Criteria for the Diagnosis of Lupus Anticoagulant/Antiphospholipid Antibody of the Scientific Committee of the ISTH. *Thrombosis and Haemostasis*. 1995;74:1185-90.
41. Chantarangkul V, Tripodi A, Clerici M, Bressi C. Effect of Residual Platelets in Plasma, Assessed by StacLOT LA and Silica Clotting Time Thrombosis and Haemostasis. 2002;87:854-8.
42. Favaloro E. Preanalytical variables in coagulation testing. *Blood coagulation and fibrinolysis*. 2007;18:86-9.
43. Chiusol F, Ferrarill I, Aparecida I, Santos T. Avaliação do desempenho dos reagentes do tempo de tromboplastina parcial ativada utilizados para detectar o

anticoagulante lúpico. *Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial*. 2005;41:159-65.

44. Stark R, Gordon S. Comparison of four laboratory tests for lupus anticoagulant. *Pathology*. 1990;22:122-3.

45. Chantarangkul V, Tripodi A, Arbini A, Mannucci P. Silica Clotting Time (SCT) as a screening and confirmatory test for detection of the lupus anticoagulants. *Thrombosis research* 1992;67:355-65.

46. Zanata L, DADAM L, CAYRES F, FERREIRA S, NEIVA T. Triagem Laboratorial para a Pesquisa de Anticoagulante Lúpico (AL) em Pacientes Atendidos no Hospital Universitário de Florianópolis,SC. *Revista Brasileira de Análises Clínicas*. 2005;37:223-5.

47. Grypiotis P, Ruffati A, Pengo V, Tonello M, Biasiolo A, Zamboni D, et al. Use of a New Silica Clotting Time for Diagnosing Lupus Anticoagulant in Patients who meet the Clinical Criteria for Antiphospholipid Syndrome. *Journal of Clinical Laboratory Analysis*. [review]. 2006;20:15-8.

48. Urbanus R, Derksen R, Groot P. Current insight into diagnostics and pathophysiology of the antiphospholipid syndrome. *Blood* 2008;2:93-105.

49. Thiagarajan P, Pengo V, Shapiro S. The use of the dilute Russell viper venom time for the diagnosis of lupus anticoagulants. *Blood* 1986;68:869-87.

50. Bowie E, Thompson J, Pascuzzi C, Owen C. Thrombosis in systemic erythenatosus despite circulating anticoagulants. *The Journal of Laboratory and Clinical Medicine*. 1963;62:416-30.

OFFICIAL COMMUNICATION OF THE SSC

Update of the guidelines for lupus anticoagulant detection

V. PENG0,* A. TRIPODI,† G. REBER,‡ J. H. RAND,§ T. L. ORTEL,¶ M. GALLI** and P. G. DE GROOT††

*Clinical Cardiology, Thrombosis Center, University Hospital, Padova; †Angelo Bianchi Bonomi Haemophilia and Thrombosis Centre, University and IRCCS Maggiore Hospital, Mangiagalli and Regina Elena Foundation, Milan, Italy; ‡Haemostasis Unit, Division of Angiology and Haemostasis, University Hospital, Geneva, Switzerland; §Hematology and Advanced Coagulation Laboratory, Montefiore Medical Center, Bronx, NY; ¶Division of Hematology, Duke University Medical Center, Durham, NC, USA; **Department of Hematology, Ospedali Riuniti, Bergamo, Italy; and ††Department of Clinical Chemistry and Haematology, University Medical Centre, Utrecht, the Netherlands

To cite this article: Pengo V, Tripodi A, Reber G, Rand JH, Ortel TL, Galli M, de Groot PG. Update of the guidelines for lupus anticoagulant detection. *J Thromb Haemost* 2009; 7: 1737–40.

Summary. One of the conclusions of the subcommittee meeting on Lupus Anticoagulant/Phospholipid dependent antibodies, held in Geneva on 2007, was the need to update the guidelines on Lupus Anticoagulant (LA) detection. Particular emphasis was given to several aspects discussed in this official communication. A new paragraph is dedicated to the patient selection, and aims to minimize inappropriate requests for LA testing. Modalities for blood collection and processing are fully delineated and the choice of tests is limited to dRVVT and a sensitive aPTT. Calculation of cut-off values for each diagnostic step are clearly stated. A final paragraph reports the interpretation of the results in general and in particular situations.

Keywords: anticoagulants, antiphospholipid syndrome, diagnosis, lupus anticoagulant, thrombosis.

These guidelines are intended to update the criteria for the detection of the presence of lupus anticoagulants (LA) that were originally proposed by Brandt *et al.* in 1995 [1]. The subcommittee on Lupus Anticoagulant/Phospholipid-dependent Antibodies acknowledges that the present guidelines have been extremely useful during the past 13 years but that it is now appropriate to provide additional details and specifications in light of the knowledge and experience that has been accumulated since their publication.

Patient selection

Testing for LA should be limited to patients who have a significant probability of having the antiphospholipid syn-

drome (APS), or who have unexplained prolonged aPTT in the course of routine laboratory testing. Appropriateness to search for LA can be graded according to clinical characteristics into low, moderate and high. *Low:* venous (VTE) or arterial thromboembolism in elderly patients; *Moderate:* accidentally found prolonged aPTT in asymptomatic subjects, recurrent spontaneous early pregnancy loss, provoked VTE in young patients; and *High:* unprovoked VTE and (unexplained) arterial thrombosis in young patients (< 50 years of age), thrombosis at unusual sites, late pregnancy loss, any thrombosis or pregnancy morbidity in patients with autoimmune diseases (systemic lupus erythematosus, rheumatoid arthritis, autoimmune thrombocytopenia, autoimmune hemolytic anaemia) [2]. Generalized searches performed on blood samples obtained from asymptomatic individuals or categories of patients other than described here are highly discouraged to avoid the risk of obtaining false-positive results that are relatively common on account of the poor specificity of the assays. Once a patient has been identified as positive for LA, it is imperative that testing be repeated on a second occasion > 12 weeks after the initial testing. It is preferable for samples to be obtained prior to, or in the absence of, anticoagulant therapy as this may interfere with the assay. Recommendations of the subcommittee are summarized in Table 1. How to determine and interpret cut-off values is described in Table 2.

Explanation and clarification of the recommendations summarized in Table 1

Numerous variables can affect assays used for LA detection. Among them, the content and type of phospholipids (PL) in the reagent mixture, activator, plasma preparation, expression of results and cut-off values greatly influence the results. Moreover, as the spectrum of antibodies and their epitope specificity may vary widely, reference material constitutes a major problem. As a consequence a high variability in the performance of clinical laboratories with respect to sensitivity and specificity of LA tests has recently been reported [3–7]. The rates of false-positive and false-negative detections remain

Correspondence: Vittorio Pengo, Clinical Cardiology, Department of Cardiac Thoracic and Vascular Sciences, Thrombosis Center, University of Padua, School of Medicine, Via Giustiniani, 2, 35128 Padova, Italy.

Tel.: +39 49 821 5658; fax: +39 49 821 5658.

E-mail: vittorio.pengo@unipd.it

Table 1 Recommendations for the optimal laboratory detection of lupus anticoagulant (LA)*

(A) Blood collection	
1.	Blood collection before the start of any anticoagulant drug or a sufficient period after its discontinuation
2.	Fresh venous blood in 0.109 M sodium citrate 9:1
3.	Double centrifugation
4.	Quickly frozen plasma is required if LA detection is postponed
5.	Frozen plasma must be thawed at 37 °C
(B) Choice of the test	
1.	Two tests based on different principles
2.	dRVVT should be the first test considered
3.	The second test should be a sensitive aPTT (low phospholipids and silica as activator)
4.	LA should be considered as positive if one of the two tests gives a positive result
5.	For interpretation see Table 2 (screening test)
(C) Mixing test	
1.	PNP for mixing studies should ideally be prepared in house. Adequate commercial lyophilized or frozen PNP can alternatively be used
2.	A 1:1 proportion of patient : PNP shall be used, without preincubation within 30 min.
3.	LA can not be conclusively determined if the TT of the test plasma is significantly prolonged
4.	For interpretation see Table 2 (mixing test)
(D) Confirmatory test	
1.	Confirmatory test(s) must be performed by increasing the concentration of PL of the screening test(s)
2.	Bilayer or hexagonal (II) phase PL should be used to increase the concentration of PL.
3.	For interpretation see Table 2 (confirmatory test)
(E) Expression of results	
1.	Results should be expressed as ratio of patient-to-PNP for all procedures (screening, mixing and confirm)
(F) Transmission of results	
1.	A report with an explanation of the results should be given

*Further explanations and qualifications are reported in the text.
PNP, pooled normal plasma; TT, thrombin time; PL, phospholipids

relatively high. The former are of particular concern because they qualify the patients for long and unnecessary oral anticoagulant treatment [7].

(A) Blood collection

A3: Double centrifugation of the sample should be performed to ensure that the sample is platelet poor. This can be achieved by transferring the plasma after the initial centrifugation process (2000 g, 15 min, room temperature) to a non-activating plastic centrifuge tube using a plastic pipette, then recentrifuging the plasma for an additional 10 min at a higher speed (> 2500 g). When aliquoting to a secondary tube, take care to not include the residual platelets that may have collected at the bottom of the centrifuge tube [8]. Plasma filtration is not recommended as this introduces variables (type of filter, amount of plasma to be filtered, loss of von Willebrand factor and added costs [9]. Moreover, the problems of filters availability and adjunctive costs must be considered.

A4: Freezing of the samples must be performed as quickly as possible after venipuncture to prevent loss of coagulation

Table 2 Cut-off values for lupus anticoagulant (LA) detection*

Cut-off values	
Screening test	
How should this be determined	
1.	Perform testing on plasmas from healthy donors
2.	Take the cut-off as the value above the 99th percentile of the distribution
Interpretation	
1.	Results of screening tests are potentially suggestive of LA when their clotting times are longer than the local cut-off value
Mixing test	
How should this be determined	
1.	Perform testing on plasmas from healthy donors mixed with the pooled normal plasma (PNP) at 1:1 proportion. Testing should be performed without pre-incubation within 30 min
2.	Take the cut-off as the value above the 99th percentile of the distribution
3.	Alternatively, the cut-off may be the value of the ICA defined according to the equation: $ICA = [(b - c)/a] \times 100$, where a, b and c are the clotting times of the patient plasma, mixture and normal plasma, respectively [16]
Interpretation	
1.	Results of mixing tests are suggestive of LA when their clotting times are longer than the local cut-off value, or when the ICA is greater than the local cut-off value
Confirmatory test	
How should this be determined	
1.	Perform testing on plasmas from healthy donors at low (screen) and high (confirm) phospholipid concentration
2.	Take the cut-off as the value corresponding to the mean of the individual % corrections calculated as defined by the equation $[(screen - confirm)/screen] \times 100^\dagger$
Interpretation	
1.	Results are confirmatory of LA if the % correction is above the local cut-off value

*Testing described above must be performed with the local reagent/coagulometer combination on plasmas from at least 40 adult healthy donors less than 50 years of age. Do not use cut-off values established elsewhere even although they refer to the same method and coagulometer.

[†]The clotting time of the confirmatory test in LA positive samples is not always shortened to within the normal range of controls. To avoid false-negative results, the Subcommittee recommends confirmatory tests to be performed in all the normal controls and to use the mean of obtained clotting times to calculate the percentage of shortening. This percentage can be used as a cut-off value.

ICA, index of circulating anticoagulant.

factors. Freezing the plasma in a freezer at -70 °C or below is reasonable.

A5: Before analysis, frozen plasma must be thawed by total immersion of sample content in a water bath at 37 °C for 5 min to avoid formation of cryoprecipitate and then mixed thoroughly before testing.

(B) Choice of the test

B1: The risk of false-positive results is increased to an unacceptable level if more than two screening tests are performed.

B2: There is evidence that no single test is sensitive for all LA. The recommendation is to perform two different tests that represent different assay principles. Diluted Russell Viper

Venom time (dRVVT) is widely used in clinical laboratories and is believed to be specific for detecting LA in those patients at high risk of thrombosis [10]. An international External Quality Assessment Programme for laboratories working in the field of thrombosis showed that dRVVT is the most robust test in detecting LA [11].

B3: Any aPTT test performed with silica as an activator and low PL content is the second test of choice because of its sensitivity [3,6] for LA. Kaolin as an activator is not recommended because of its problematic behaviour in automated coagulometers. Ellagic acid as an activator is not recommended as a result of its insensitivity for LA. The Subcommittee does not recommend the following tests: dilute prothrombin time (dPT) because of variability in thromboplastin reagents; assays based on snake venoms such as Ecarin and Textarin because there are no standardized commercial assays available based on this principle; Kaolin Clotting Time (KCT) as a result of its poorer reproducibility compared with the other tests available [11].

(C) Mixing test

C1: The pooled normal plasma (PNP) should be prepared '*ad hoc*' (home-made) by double centrifugation to ensure that the PNP contains minimal residual platelets ($< 10^7 \text{ mL}^{-1}$) and to ensure approximately 100% activity for all clotting factors. The material must be stored frozen (-70°C) in small aliquots. Commercial lyophilized or frozen normal plasmas can be used if they fulfill the above specifications or have otherwise been validated for use in LA testing. When testing for LA during pregnancy, normal range(s) of clotting times defined for normal pregnant women should be considered (aPTT is, in general, shortened as a result of high factor VIII levels during pregnancy, but also dRVVT can change for unknown reasons). No reference plasma is available. Therefore, established positive and negative plasmas should be used as controls to validate the assay.

C3: The coagulation time of a mixing test could also be prolonged because of the presence of heparin or inhibitors to coagulation factors. The thrombin time (TT) performed on test plasma or the clinical history of bleeding will help to identify heparin or specific inhibitors to clotting factors, respectively. LA screening is not possible if the test plasma is unclottable or if the content of heparin in the test plasma exceeds the reagent neutralization capacity. There are commercial dRVVTs and APTTs containing neutralizers able to quench heparin up to 0.8 U mL^{-1} . Although limited experience is available on the effect of low-molecular-weight heparin (LMWH), screening for LA in patients treated with LMWH is possible. It should, however, be noted that the effect on LA assays may vary depending on the ratio between factor (F) Xa to FIIa activity of each LMWH preparation. The effect of direct thrombin or FXa inhibitors on LA assays is unknown. Whereas hydroxychloroquine may weakly interfere with LA testing directly affecting the formation of IgG- $\beta 2\text{GPI}$ complexes on phospholipid bilayers [12], aspirin and clopidogrel do not interfere.

(D) Confirmatory test

D2: Freeze/thawed platelets are not recommended as the source of PL for the confirmatory tests because of poor batch-to-batch consistency.

(F) Transmission of results

F1: LA test results should be reported with quantitative results, and an interpretative comment that indicates whether the findings are compatible with the presence/absence of LA. This is important as many clinicians may not be aware of the significance of all the complex testing procedures carried out by the laboratory. Comments such as borderline or dubious LA are highly discouraged and in these cases the comment should be limited to the following: 'to be tested again in 1 week'.

Interpretation of results

Integrated tests

Integrated tests include screening and confirmation in a single procedure. Such tests consist of testing the plasmas under investigation twice by means of the dRVVT [13] or APTT [13,14] performed in parallel at low (screen) and high (confirm) phospholipid concentrations. In principle, these tests do not require performance of the mixing test and the results may be interpreted according to the specific cut-off values by calculating either the percentage correction [(screen – confirm)/screen $\times 100$] [13] or the LA ratio (screen/confirm) [15]. Both the percentage correction and the LA ratio may benefit from normalization of results against a PNP run in parallel with the test plasmas [(screen/confirm) patient divided by (screen/confirm) PNP]. Some of the above tests are designed to measure the coagulation times on a mixture of patient and PNP [14].

LA detection during acute thromboembolic events Caution should be exercised in interpretation of the results of tests performed close to a thromboembolic event as patients may be treated with full doses of unfractionated heparin and/or vitamin K antagonists (VKA). Furthermore, acute-phase reactants as FVIII may be increased during acute events.

LA detection in patients on long-term vitamin K antagonists (VKA)

- 1 The interpretation of results is difficult because of the prolonged basal clotting time. To avoid misinterpretation, it is recommended to perform laboratory procedures 1 to 2 weeks after discontinuation of treatment or when the international normalized ratio (INR) is less than 1.5. Bridging VKA discontinuation with LMWH is recommended with the last dose of LMWH administered more than 12 h before the blood is drawn for LA testing.
- 2 Alternatively, if the INR is between 1.5 and < 3.0 , a 1:1 dilution of patient plasma and PNP can be considered. Note,

that the interpretation of results may still be difficult and that the LA titer will be diluted 2-fold.

- 3 Detection procedures by Textarin(Taipan)/Ecarin clotting times [17,18] or integrated tests (i.e. % correction for APTT, SCT and dRVVT at low and high phospholipid concentration) [13] are not currently recommended as they require further critical evaluation.

Antiphospholipid antibody profiles A LA result should always be considered in the context of a full laboratory aPL profile comprising anticardiolipin (aCL) and anti β 2glycoprotein I (a β 2GPI) antibodies ELISAs. The presence of medium-high titers aCL and a β 2GPI of the same isotype (most often IgG) is in agreement with a positive LA and identifies patients at high risk for thrombosis. Less information is available for the correlations with fetal losses. Isolated LA positivity is significantly more frequent in subjects without clinical events [19] or may be false-positive especially if identified as 'mild in potency', if it is found in elderly patients or if it is diagnosed for the first time [7].

Acknowledgements

The authors would like to thank the following colleagues who helped in writing these guidelines with suggestions and comments: Katrien M.J Devreese, Ghent, Belgium; Annie Robert, Paris, France; Alicia N Blanco, Buenos Aires, Argentina; Beatriz E Grand, CABA, Argentina; Ricardo Forastiero, Buenos Aires, Argentina; Tatsuya Atsumi, Sapporo, Japan; Galit Sarig, Haifa, Israel; E Favaloro, Westmead, Australia; Veena Chantarangkul, Milano, Italy.

Disclosure of Conflict of Interests

The authors state that they have no conflict of interest.

References

- 1 Brandt JT, Triplett DA, Alving B, Scharrer I. Criteria for the diagnosis of lupus anticoagulants: an update. On behalf of the Subcommittee on Lupus Anticoagulant/Antiphospholipid Antibody of the Scientific and Standardisation Committee of the ISTH. *Thromb Haemost* 1995; **74**: 1185–90.
- 2 Miyakis S, Lockshin MD, Atsumi T, Branch DW, Brey RL, Cervera R, Derksen RHWM, de Groot PG, Koike T, Meroni PL, Reber G, Shoenfeld Y, Tincani A, Vlachoyiannopoulos PG, Krilis SA. International consensus statement on an update of the classification criteria for definite antiphospholipid syndrome (APS). *J Thromb Haemost* 2006; **4**: 295–306.
- 3 Tripodi A, Biasiolo A, Chantarangkul V, Pengo V. Lupus anticoagulant (LA) testing: performance of clinical laboratories assessed by a national survey using lyophilized affinity-purified immunoglobulin with LA activity. *Clin Chem* 2003; **49**: 1608–14.
- 4 Jennings I, Kitchen S, Woods TA, Preston FE, Greaves M. Potentially clinically important inaccuracies in testing for the lupus anticoagulant: an analysis of results from three surveys of the UK National External Quality Assessment Scheme (NEQAS) for Blood Coagulation. *Thromb Haemost* 1997; **77**: 934–7.
- 5 Favaloro EJ, Bonar R, Sioufi J, Wheeler M, Low J, Aboud M, Duncan E, Smith J, Exner T, Lloyd J, Marsden K. Multilaboratory testing of thrombophilia: current and past practice in Australasia as assessed through the Royal College of Pathologists of the Australasia Quality Assurance Programs for Hematology. *Semin Thromb Haemost* 2005; **31**: 49–58.
- 6 Arnout J, Meijer P, Vermeylen J. Lupus anticoagulant testing in Europe: an analysis of results from the first European Concerted Action on Thrombophilia (ECAT) survey using plasmas spiked with monoclonal antibodies against human β 2-glycoprotein I. *Thromb Haemost* 1999; **81**: 929–34.
- 7 Pengo V, Biasiolo A, Gresele P, Marongiu F, Erba N, Veschi F, Ghirarduzzi A, de Candia E, Montaruli B, Testa S, Barcellona D, Tripodi A. on behalf of participating centers of Italian Federation of Thrombosis Centers (FCSA). Survey on lupus anticoagulant diagnosis by central evaluation of positive plasma samples. *J Thromb Haemost* 2007; **5**: 925–30.
- 8 Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). *Collection, Transport, and Processing of Blood Specimens for Testing Plasma-Based Coagulation Assays and Molecular Hemostasis Assays; Approved Guideline – Fifth Edition*. CLSI document H21-A5 (ISBN 1-56238-657-3). Clinical and Laboratory Standards Institute, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pennsylvania 19087–1898 USA, 2008.
- 9 Favaloro EJ. Preanalytical variables in coagulation testing. *Blood Coagul Fibrinolysis* 2007; **18**: 86–9.
- 10 Galli M, Finazzi G, Bevers EM, Barbui T. Kaolin clotting time and dilute Russell viper venom time distinguish between prothrombin-dependent and β 2-glycoprotein I-dependent antiphospholipid antibodies. *Blood* 1995; **86**: 617–23.
- 11 Urbanus RT, Derksen RH, de Groot PG. Current insight into diagnostics and pathophysiology of the antiphospholipid syndrome. *Blood Rev* 2008; **2**: 93–105.
- 12 Rand JH, Wu XX, Quinn AS, Chen PP, Hathcock JJ, Taatjes DJ. Hydroxychloroquine directly reduces the binding of antiphospholipid antibody- β 2-glycoprotein I complexes to phospholipid bilayers. *Blood* 2008; **112**: 1687–95.
- 13 Tripodi A, Chantarangkul V, Clerici M, Mannucci PM. Laboratory diagnosis of lupus anticoagulants for patients on oral anticoagulant treatment: performance of dilute Russell viper venom test and silica clotting time in comparison with Sta clot LA. *Thromb Haemost* 2002; **88**: 583–6.
- 14 Triplett DA, Barna LK, Unger GA. A hexagonal (II) phase phospholipids neutralization assay for lupus anticoagulant identification. *Thromb Haemost* 1993; **70**: 787–93.
- 15 Jacobsen EM, Barna-Cler L, Taylor JM, Triplett DA, Wisloff F. The Lupus Ratio test: an interlaboratory study on the detection of Lupus anticoagulants by an APTT-based, integrated, and semiquantitative test. Fifth International Survey of Lupus Anticoagulants ISLA 5. *Thromb Haemost* 2000; **83**: 704–8.
- 16 Rosner E, Pazner R, Lusky A, Modan M, Many A. Detection and quantitative evaluation of lupus circulating anticoagulant activity. *Thromb Haemost* 1987; **57**: 144–7.
- 17 Triplett DA, Stocker KF, Unger GA, Barna LK. The Textarin/Ecarin ratio: a confirmatory test for lupus anticoagulants. *Thromb Haemost* 1993; **70**: 925–31.
- 18 Moore GW, Smith MP, Savidge GF. The Ecarin time is an improved confirmatory test for the Taipan snake venom time in warfarinized patients with lupus anticoagulants. *Blood Coagul Fibrinolysis* 2003; **14**: 307–12.
- 19 Pengo V, Biasiolo A, Gresele P, Marongiu F, Erba N, Veschi F, Ghirarduzzi A, Barcellona D, Tripodi A. A comparison of lupus anticoagulant-positive patients with clinical picture of antiphospholipid syndrome and those without. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2007; **27**: 309–10.